

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003年10月23日 (23.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/087163 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 16/46, C12N 15/09
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/04773
- (22) 国際出願日: 2003年4月15日 (15.04.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-112369 2002年4月15日 (15.04.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小嶋 哲郎 (KOJIMA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP)
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF CONSTRUCTING scDb LIBRARY

(54) 発明の名称: scDbライブラリーの作成方法

(57) Abstract: By disposing restriction enzyme sites appropriately for antigen-encoding regions, a bispecific Db library can be efficiently and collectively constructed from a scFv library without resort to any troublesome procedures.

(57) 要約: 制限酵素部位を抗原コード領域に対して適切に配置することにより、二特異性Dbライブラリーを効率的に、煩雑な操作を用いずにscFvライブラリーより一括処理により構築することが可能となった。

WO 03/087163 A1

- 1 -

## 明細書

## s c D b ライブラリーの作成方法

技術分野

本発明は、単鎖ダイアボディ(single chain diabody; scDb)ライブラリー及びその作成方法に関する。また、本発明は該単鎖ダイアボディライブラリーを構成する遺伝子、及び、該遺伝子を含む発現ベクター、並びに、それらの作成方法に関し、さらに、該遺伝子によりコードされるペプチドに関する。

背景技術

異なる抗原に結合することができる多特異性抗体(例えば、二特異性抗体(BsAb))は免疫診断、治療及び免疫学的検定による診断等の臨床分野において有用である。多特異性抗体は、例えば、酵素免疫分析で用いられる酵素を固定化する際に利用することができる。即ち、多特異性抗体の一方の腕を酵素上の酵素反応を阻害しない部分のエピトープと結合するように、そしてもう一方の腕は固定化する担体上に対して結合するように設計し、担体上に酵素を抗体を介して結合する(例えば、Hammerling et al., J.Exp.Med. 128: 1461-1473 (1968))。また、多特異性抗体を癌等の様々な疾病の免疫診断において利用する方法も報告されている(Songsivilai et al., Clin.Exp.Immunol. 79: 315 (1990))。癌の診断において使用される二特異性抗体は、例えば、抗体の一方の腕が腫瘍関連抗原を認識するように設計され、他方は検出可能なマーカーに結合するように設計される(例えば、Le Doussal et al., Int.J.Cancer Suppl. 7: 58-62 (1992); Le Doussal et al., J. Nucl.Med. 34: 1662-1671 (1993); Stickney et al., Cancer Res. 51: 6650-6655 (1991))。

さらに、病原体または腫瘍細胞に対する患者の細胞性免疫応答の誘発において

- 2 -

多特異性抗体を利用する方法も知られている(Segal et al., Chem.Immunol. 47: 179 (1989); Segal et al., Biologic Therapy of Cancer 2(4) De Vita et al. eds., J.B.Lippincott, Philadelphia (1992) p.1; Hsieh-Ma et al., Cancer Res. 52: 6832-6839 (1992); Weiner et al., Cancer Res. 53: 94-100 (1993))。また、多特異性抗体はT細胞の細胞を殺す作用を誘起するように設計することもできる(Shalaby et al., J.Exp.Med. 175(1): 217 (1992); de Liji et al. "Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity", Romet-Lemonne, Fanger and Segal Eds., Lienhart (1991)p.249; Clark et al. "Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity", Romet-Lemonne, Fanger and Segal Eds. Lienhart (1991)p.243; Kroesen et al., Cancer Immunol.Immunother. 37: 400-407 (1993); Kroesen et al., Br.J.Cancer 70: 652-661 (1994); Weiner et al., J.Immunol. 152: 2385 (1994))。その他、多特異性抗体は、繊維素溶解剤またはワクチンのアジュバントとしても利用し得るし、感染性の疾患(例えば、HIV、インフルエンザ、原生虫等に感染した細胞を標的として)の治療用、腫瘍細胞へ抗毒素の運搬、及び、細胞表面受容体へ免疫複合体を作用させるためにも利用することができる(Fanger et al., 上述)。

従来、多特異性抗体は、(1)異なる特異性を有する抗体の異種二機能性リンカーによる化学的カップリング(Paulus, Behring Inst.Mitt., 78:118-132 (1985))、(2)異なるモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞の融合 (Millstein and Cuello, Nature 305: 537-539 (1983))、及び(3)異なるモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子(4種類の遺伝子)のマウス骨髓腫細胞または他の真核細胞発現系へのトランスフェクションとそれに続く二特異性の一価部分の単離(Zimmermann, Rev.Physio.Biochem.Pharmacol. 105: 176-260 (1986); Van Dijk et al., Int.J.Cancer 43: 944-949 (1989))等の方法により製造されてきた。

ダイアボディ(Db)は、遺伝子融合により構築された二価(bivalent)の抗体断片である(P.Holliger et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 6444-6448 (1993)、EP

## - 3 -

404,097号、W093/11161号等)。ダイアボディは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中で軽鎖可変領域(VL)及び重鎖可変領域(VH)が、互いに結合できない位に短い、例えば、5残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされる VL と VH とは、その間のリンカーが短いため単鎖 V 領域フラグメント(scFv)を形成することが出来ず二量体を形成するため、ダイアボディは2つの抗原結合部位を有することとなる。このとき2つの異なる抗原(a、b)に対する VL と VH を VL<sub>a</sub>-VH<sub>b</sub> と VL<sub>b</sub>-VH<sub>a</sub> の組合わせて5残基程度のリンカーで結んだものを同時に発現させると二特異性 Db として分泌される。二特異性 Db は多特異性抗体の一種である。

#### 発明の開示

二特異性 Db においては、2種類の鎖の組み合わせは3通りあるため、得られる二特異性 Db は全体の50%に留まる。一方、ファージ抗体ライブラリーを用いて抗原との反応性により特定の遺伝子を選択するためには、抗原結合部位を scFv として提示させるために VH と VL を15残基程度のリンカーで結合して発現させる必要がある。このように抗原との結合性により選択されたファージ抗体ライブラリー由来の scFv の VH と VL を二特異性 scDb として発現させるためには、リンカーの長さを scFv の発現に必要なとされる15残基程度のものから、Db の発現に可能な5残基程度の長さのリンカーに換えるための PCR アセンブル等の煩雑な操作が必要となり、一括処理することは困難であった。

本発明により、新規な二特異性 scDb ライブラリーの構築法が提供される。本発明においては、二特異性 Db を確実に生産できるよう、2つの異なる抗原(a、b)に対する VL と VH を VL<sub>a</sub>-VH<sub>b</sub>-VL<sub>b</sub>-VH<sub>a</sub> の順に、VH<sub>b</sub> と VL<sub>b</sub> の間は15残基以上のリンカーで結んだ単鎖として発現させる(但し、本発明は VL<sub>a</sub>、VH<sub>a</sub>、VL<sub>b</sub>、VH<sub>b</sub> 等の変領域の順序で限定されるものではない)。本発明では、このようなポリペプチド鎖(VL<sub>a</sub>-VH<sub>b</sub>-VL<sub>b</sub>-VH<sub>a</sub>)を発現する二特異性 scDb ライブラリーを scFv のファ

- 4 -

ージライブラリーから一括処理により作成することができる。即ち、2つの抗体可変領域(VLaとVHa)をコードするヌクレオチドが制限酵素切断部位を有するリンカーで結ばれた遺伝子、及び、2つの抗体可変領域(VLbとVHb)をコードするヌクレオチドが長いリンカーにより結ばれ、可変領域をコードするヌクレオチドのリンカーと結合されていない側に制限酵素切断部位を有する遺伝子を用い、これらを制限酵素で処理した後、VLaとVHaの間にVLb及びVHbが挟まれるように結合させる。本発明は、このような二特異性 scDb ライブラリーの構築法に加え、該方法に用い得る遺伝子、該方法により得られる遺伝子、これらの遺伝子を含む発現ベクターまたは抗体ライブラリー、及び、該遺伝子によりコードされるペプチドを提供する。

また、本発明では、抗原との結合で選択された scFv の VH と VL を二特異性 scDb として一括処理で発現させる方法として、ファージ抗体ライブラリーからパンニング等によって濃縮した抗体クローンを一括して動物細胞用の発現ベクターに移す方法を提案する。より詳細には、本発明は、

- (1) 2つの抗体可変領域をコードし、一方の抗体可変領域と他方の抗体可変領域が制限酵素切断部位を有するリンカーで結ばれている遺伝子、
- (2) リンカーに制限酵素切断部位が2つ以上存在することを特徴とする(1)記載の遺伝子、
- (3) 2つの抗体可変領域の一方が重鎖可変領域であり、他方が軽鎖可変領域である(1)または(2)記載の遺伝子、
- (4) 2つの抗体可変領域が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする(1)～(3)いずれか記載の遺伝子、
- (5) 2つの抗体可変領域をコードし、その両端に制限酵素切断部位を付加した遺伝子、
- (6) 2つの抗体可変領域の一方が重鎖可変領域であり、他方が軽鎖可変領域である(5)記載の遺伝子、

- 5 -

- (7) 2つの抗体可変領域をコードする遺伝子が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする(5)または(6)記載の遺伝子、
  - (8) 4つの抗体可変領域をコードし、1番目の抗体可変領域と2番目の抗体可変領域の間、及び3番目の抗体可変領域と4番目の抗体可変領域の間に制限酵素切断部位が存在することを特徴とする遺伝子、
  - (9) 1番目と2番目の抗体可変領域の間及び3番目と4番目の抗体可変領域の間に短いリンカーで結ばれ、2番目と3番目の抗体可変領域の間が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする(8)記載の遺伝子、
  - (10) 4つの抗体可変領域が第一の抗原に対する重鎖可変領域、第一の抗原に対する軽鎖可変領域、第二の抗原に対する重鎖可変領域、第二の抗原に対する軽鎖可変領域である(8)または(9)記載の遺伝子、
  - (11) 第一の抗原に対する軽鎖可変領域、第二の抗原に対する重鎖可変領域、第二の抗体に対する軽鎖可変領域、第一の抗原に対する重鎖可変領域の順に並んでいる(10)記載の遺伝子、
  - (12) 以下の工程を含む二特異性単鎖ダイアポディーをコードする遺伝子の作成方法
    - (a) (1) ~ (4) 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、
    - (b) (5) ~ (7) 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び
    - (c) (b)の工程で作成した遺伝子を、(a)の工程で作成した遺伝子の間に挿入する工程、
- を含む方法、
- (13) (1) ~ (11) いずれかの記載の遺伝子によりコードされるペプチド、
  - (14) (1) ~ (11) のいずれか記載の遺伝子を含む抗体ライブラリー、
  - (15) 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法、
    - (a) 第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素部位を含む長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、

- (b)第二の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域が長いリンカーで結ばれ、それぞれの可変領域のリンカーが付加していない側に制限酵素部位が存在している抗体ファージライブラリーを作成する工程、
- (c)(a)及び(b)で作成したファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、
- (d)上記処理により得られたフラグメントをライゲーションすることにより、第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域の間に、第二の抗原に対する重鎖可変領域と軽鎖可変領域が挿入されたフラグメントを作成する工程、
- (16)以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法
- (a)(1)～(4)記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、
- (b)(5)～(7)記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び
- (c)(b)の工程で作成した遺伝子を、(a)の工程で作成した遺伝子の間に挿入する工程、
- (17)以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法、
- (a)抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素切断部位が2つ以上存在する長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、
- (b)上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び
- (c)上記処理により得られたフラグメントをセルフライゲーションすることにより、可変領域間のリンカーを短いリンカーにする工程、並びに
- (18)(1)～(11)いずれか記載の遺伝子を含む発現ベクターに関する。

本発明の方法は、二特異性 scDb のみならず一特異性 scDb (例えば、同じエпитープを認識するが配列の異なる可変領域を有する scDb など) のスクリーニング

にも応用できる。

本発明の scDb ライブラリーの作成方法においては、例えば、まず図 1 に示すように、抗原 A を免疫した動物の脾臓等から VL-VH の順につないだ抗体ファージライブラリーを構築する。抗体ファージライブラリーは、公知の方法に従って構築することができる(例えば、McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990); Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J.Mol.Biol. 222: 582-597 (1991)等参照)。

動物を免疫化する抗原としては、免疫原性を有する完全抗原と、免疫原性を有さない不完全抗原(ハプテンを含む)が挙げられる。蛋白質、ポリペプチド、多糖類、核酸、脂質等からなる物質が抗原として挙げられ、本発明において、特に抗原を構成する物質の種類は限定されない。動物を免疫するのに用いる免疫原としては、場合により抗原となるものを他の分子に結合させ可溶性抗原とすることも可能であり、また、場合によりそれらの断片を用いてもよい。受容体のような膜貫通分子を抗原として用いる場合、これらの断片(例えば、受容体の細胞外領域)を用いるのが好ましい。また、膜貫通分子を細胞表面上に発現する細胞を免疫原とすることもできる。このような細胞は天然(腫瘍セルライン等)由来、または、組換え技術により膜貫通分子を発現するように構成された細胞であり得る。

二特異性 Db は、従来知られている二特異性抗体と同様に使用することができるものである。そこで癌の治療を目的として、例えば、一方の腕を腫瘍細胞抗原を認識するようにし、他方が細胞傷害性を誘起する分子を認識するように設計することができる。この場合、腫瘍細胞抗原としては例えば CD15、p185<sup>HER2</sup>、1D10(悪性 B 細胞)、p97、腎細胞癌、OVCAR-3、L-D1(大腸癌)、メラノサイト刺激ホルモンアナログ、EGF 受容体、CAMA1、MoV18、CD19、神経細胞接着分子(neural cell adhesion molecule; NCAM)、葉酸結合蛋白質(FBP)、AMOC-31 (pan carcinoma associated antigen)、Id-1、CD22、CD7、CD38、CEA を選択することができる。また、細胞傷害性を誘起する分子としては、Fc $\gamma$ RI、CD16、CD3 等を挙げることができ



る。また、上述の細胞障害性を誘起する分子に代えて、例えば、サボニン、リシンのA鎖、IFN- $\alpha$ 、ビンカルカロイド等の毒素と結合するようにDbを設計することもできる。このような二特異性Dbは癌の治療において特に有用である。

又、二特異性Dbはアゴニスト抗体としても有用である。例えば、多くのサイトカイン受容体ではホモ又はヘテロ二量体を形成しており、リガンドが結合することによって二量体を形成する鎖間の距離・角度が変化して細胞内にシグナルを伝えうるようになると考えられている。従って、このような二量体を形成する受容体に結合する二特異性Dbは、リガンドによる受容体の二量体化を模倣でき、アゴニストDbとなり得る。

その他の二特異性Dbとしては、(1)CD30及びアルカリホスファターゼに結合し、その結果、リン酸マイトマイシンをマイトマイシナルコールに変換するDb等、物質の変換を助ける酵素を伴うもの、(2)繊維素溶解剤として用い得る、フィブリン、tPA、uPA等に結合するDb、(3)LDL及びFc受容体(Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIまたはFc $\gamma$ RIII)等に結合し免疫複合体を細胞表面受容体へ誘導するDb、(4)CD3等のT細胞上の抗原と、HCV、インフルエンザ、HIV等の病原菌の抗原を認識する感染性の疾患に用い得るDb、(5)腫瘍の検出に用い得る腫瘍抗原と、EOTUBE、DPTA、ハプテン等の検出可能な物質に結合性を有するDb、(6)ワクチンアジュバントとして用い得るDb(Fanger et al., Crit.Rev.Immunol. 12: 101-124 (1992)参照)、並びに(7)診断において使用し得るウサギIgG、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、FITC、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ等の検出可能な物質と、ホルモン、フェリチン、ソマトスタチン、サブスタンスP、CEA等を抗原とするDbが挙げられる。しかしながら、本発明のDbはこれらに限定されるものではない。

次に抗原を用いて適当な哺乳動物を免疫する。例えば、マウス、ハムスター、またはアカゲザル等の動物を免疫化に使用することができる。また、*in vitro*においてリンパ球を免疫化することもできる。その後、免疫化された動物の脾臓またはリンパ球中に含まれる抗体をコードするDNAを、慣用の方法(例えば、抗体重

鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるヌクレオチドプロープ等を用いる方法)により単離する。

本発明における、H鎖及びL鎖可変領域とは、免疫グロブリンのH鎖及びL鎖のうち、N末端から通常約110残基のアミノ酸からなる部分を指す。免疫グロブリンは、異なるクラス(IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM)に分類され、さらにこれらは幾つかのサブクラス(アイソタイプ)(例えば、IgG-1、IgG2、IgG-3、及びIgG-4、並びにIgA-1、及びIgA-2等)に分類されるが、本発明のH鎖及びL鎖可変領域は、これらいずれのクラス及びサブクラスに属するものであってもよく、特に限定されない。

さらに、本発明の抗体可変領域は所望の抗原との結合性を有している限り、より短いまたは改変された抗体断片であってもよい。「Fv」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位とを含むものである。この領域は1つのH鎖及びL鎖の可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである。各可変領域中に存在する3つの相補性決定領域(超可変部;CDR)が相互作用し、ダイマーの表面上に抗原結合部位を形成している。即ち、H鎖とL鎖をあわせて6つのCDRが抗体の抗原結合部位として機能している。しかしながら、1つの可変領域であっても全結合部位を含む場合よりは低い親和性ではあるものの、抗原を認識し、結合する能力を有していることが知られている。従って、本発明におけるDbを構成する抗体可変領域は、Fv断片が特に好ましいが、これに限定されるものではなく、H鎖またはL鎖のCDRが保存され抗原を認識し、結合する能力を有する領域であればよい。

また、遺伝子工学的に非ヒト哺乳動物(マウス、ラット、ハムスター等)由来のモノクローナル抗体のCDR以外の部分をヒト免疫グロブリン由来の可変領域の枠組構造配列に置き換え「ヒト化抗体」とする技術が公知である(例えば、Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); Presta Curr.Op.Struct.Biol. 2: 593-596 (1992)参照)。ヒト化抗体は、

- 10 -

レシピエント抗体に導入させた CDR または枠組構造配列のどちらにも含まれないアミノ酸残基を含んでいてもよい。通常、このようなアミノ酸残基の導入は、抗体の抗原認識・結合能力をより正確に至適化するために行われる。本発明の変換領域はヒト化等の改変された可変領域も包含する。

その他の可変領域を、抗原との結合性等の抗体の生物学的特性を改善するために改変することもできる。このような改変は、部位特異的変異(Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 (1985)参照)、PCR 変異、カセット変異等の方法により行うことができる。一般に、生物学的特性の改善された抗体変異体は 70%以上、より好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上(例えば 95%以上)のアミノ酸配列相同性・類似性を元となった抗体 H 鎖または L 鎖の可変領域のアミノ酸配列と有する。本明細書において、配列の相同性・類似性は、配列相同性が最大の値を取るようにより必要に応じ配列を整列化、及びギャップ導入した後、元となった抗体残基と相同(同じ残基)または類似(一般的なアミノ酸の側鎖の特性に基づき同じグループに分類されるアミノ酸残基)するアミノ酸残基の割合として定義される。

通常、天然のアミノ酸残基は(1)疎水性：ノルロイシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン、(2)中性親水性：システイン、セリン、スレオニン、アスパラギン及びグルタミン、(3)酸性：アスパラギン酸及びグルタミン酸、(4)塩基性：ヒスチジン、リシン及びアルギニン、(5)鎖の配向に影響する残基：グリシン及びプロリン、並びに(6)芳香族性：トリプトファン、チロシン及びフェニルアラニンのグループに各々のアミノ酸の側鎖の性質に基づき分類される。

続いて、単離した重鎖及び軽鎖の DNA を間に 20 残基程度の長さのリンカーを用い結合し、適当なファージベクターに組み込み、ファージライブラリーを作成する。このとき、リンカーの中に、例えば制限酵素 *Bam*HI、*Acc*III 等の認識配列を配しておく。このようなリンカーとしては、例えば以下のような配列を有するものを例示することができる：

- 11 -

BamHI

AccIII

GGTGGTGGT**GGATCC**GGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGCGGC**TCCGGA**GGTGGTGGTCT (配列番号: 1)CCACCACC**CTAGGCC**ACCACCACCAAGACCGCGCGCC**GAGGCT**CCACCACCAAGA

GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer (配列番号: 2)

その他、本発明において使用し得る制限酵素認識配列としては、例えば BamHI、AccIII、AluI、EcoRI、HincII、HindIII、HinfI、NotI、SacI、SalI、Sau3AI、SmaI、TaqI、XbaI、AatI、BclI、BstEII、EheI、KpnI、NheI、PstI、PvuII、SfiI、BglI、HaeIII、HhaI、HpaII、XhoI 等が挙げられる。

また、ファージライブラリーを構成するファージとしては、G4 ファージ、M13 ファージ、fd ファージ、f1 ファージ、入ファージ、T4 ファージ、T7 ファージ、P1 ファージ、MS2 ファージ、ΦK ファージ、ΦX174 ファージ、λgWES、λB、Charon n 4A、Charon30 等を例示することができる。

同様にして抗原 A とは異なる抗原、または同じ抗原(例えば、エピトープが異なる場合など)により動物またはリンパ球を免疫化し、抗体の重鎖または軽鎖をコードする DNA を単離し、20 残基程度の長さのリンカーを用い VH-VL の順につないだ抗体ファージライブラリーを構築する。このとき、抗原 A に結合する VL<sub>a</sub> と VH<sub>a</sub> とをコードする遺伝子の間に、抗原 B に結合する VH<sub>b</sub> 及び VL<sub>b</sub> をコードする遺伝子を挿入することができるように VH<sub>b</sub> の 5' 末端、及び VL<sub>b</sub> の 3' 末端に制限酵素により認識される配列を設ける。即ち、抗原 A についてのライブラリーを制限酵素 BamHI、AccIII 等の認識配列を配して作成した場合には、VH の 5' 末端には BamHI を、VL の 3' 末端には AccIII を配しておく。

次に、上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子 (例えば、バンニング等で濃縮したそれぞれのライブラリーのファージミド(例えば、Vaughan et al., Nature Biotechnology 14: 309-314 (1996)参照)あるいは上記ファージライブラリーから PCR を用いて増幅した遺伝子など)を、リンカー並びに VL 及び VH をコードする遺伝子の末端に配置した制限酵素、例えば上記 BamHI と AccIII の認識部位を含むリンカーを用いた場合には、

## - 12 -

BamHI と AccIII で処理する。得られた抗原 B に対する抗体の VH-VL 断片をコードする遺伝子を抗原 A に対する抗体ファージミドの BamHI と AccIII の間に挿入する。これによって抗 A 抗体と抗 B 抗体の様々な組み合わせの discDb のライブラリーが構築できる。

本発明において、「リンカー」は、その両端に連結された抗体可変領域の発現を阻害するものでなければ特に限定されず、制限酵素切断部位を有していても、有していなくてもよい。ここで、「長いリンカー」とは、抗体の H 鎖可変領域と L 鎖可変領域を該リンカーを結んでファージライブラリー上に発現させた場合に、scFv として提示される長さのリンカーのことを意味する。その鎖長は特に制限されないが、好ましくは 30~150bp の鎖長を有し、さらに好ましくは 36~90bp の鎖長を有し、特に好ましくは 45~60bp の鎖長を有する。また、「短いリンカー」とは、抗体の H 鎖可変領域と L 鎖可変領域を該リンカーで結んで発現させた場合に、二量体(diabody:Db)を形成するリンカーのことを意味し、その鎖長は特に制限されないが、好ましくは 6~27bp の鎖長を有し、さらに好ましくは 9~21bp の鎖長を有し、特に好ましくは 12~18bp の鎖長を有する。

さらに、VL<sub>a</sub> 及び VH<sub>a</sub> をコードする遺伝子のリンカーとは逆側の部分にも適当な制限酵素認識部位を設けておくことにより VL<sub>a</sub>-VH<sub>b</sub>-VL<sub>b</sub>-VH<sub>a</sub> をコードする断片を切出し、適当な発現ベクターへ挿入し、発現させ、その生物活性を指標に目的とする Db をコードする遺伝子をスクリーニングすることができる。例えば、上述のように抗原 A 及び抗原 B に対するファージ抗体ライブラリーにおいて BamHI 及び AccIII を用いている場合には、図 1 において示すように SfiI 等の別の制限酵素を用いて適当な発現ベクターに挿入することが出来る。指標とする生物活性としては、例えば、抗原と特異的に結合する活性が挙げられ、抗原の種類によっては阻害活性、アゴニスト活性、アンタゴニスト活性等も挙げられる。例えば、サイトカイン受容体に対する抗体ライブラリーを用いて構築した bDiscDb ライブラリーについては、レトロウイルスベクター等のベクターに挿入し、目的サイトカイ

- 13 -

ン依存性増殖細胞に感染させることによってアゴニスト biDb を選択することができる。

本発明の Db を発現させるための発現系を構築するための手順および宿主に適合した組換えベクターの構築は遺伝子工学の分野において慣用の技術を用いて行うことができる(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratories (1989)等参照)。宿主細胞としては、細菌等の原核生物、並びに、酵母、動物細胞、昆虫細胞及び植物細胞等の真核細胞等、本発明の Db を発現できる細胞であればいずれも用いることができる。特に、グリコシル化の点から考えると哺乳動物細胞が好ましい。

発現ベクターは、遺伝情報の転写及び翻訳を制御するプロモーター、ターミネーター等のユニットを含む必要がある。例えば、大腸菌等のエシェリシア属の微生物を宿主細胞とする場合、プラスミドベクターとして pBR、pUC 系プラスミドを利用することができ lac、trp、tac、trc、入ファージ PL、PR 等に由来するプロモーターが利用可能である。また、ターミネーターとしては trpA 由来、ファージ由来、rrnB リボソーム RNA 由来のものを用いることができる。枯草菌等のバチルス属の微生物を宿主とする場合については、pUB110 系、pC194 系等のプラスミドが知られており、場合により遺伝子を染色体にインテグレートすることもできる。プロモーター・ターミネーターとして apr、npr、amy 等由来のものが利用できる。その他、原核細胞としてはシュードモナス属(例えば、*Pseudomonas putida*, *P. cepacia* 等; pKT240 等のベクター)、ブレヴィバクテリウム属(例えば、*Brevibacterium lactofermentum*; pAJ43 等)、コリネバクテリウム属(例えば、*Corynebacterium glutamicum* 等; pCS11、pCB101 等)、ストレプトコッカス属(pHV1301、pGK1 等)、ラクトバチルス属(pAM $\beta$ 1 等)、ロドコッカス属(*Rhodococcus rhodochrous* 等より単離されたプラスミド(J.Gen.Microbiol. 138: 1003 (1992))等)、ストレプトマイセス属(例えば、*Streptomyces lividans*, *S. virginiae* 等; pIJ486、pKC1064、pUWL-KS 等)、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレブシエラ属、ブ

## - 14 -

ロテウス属、サルモネラ属(*Salmonella typhimurium* 等)、セラチア属(*Serratia marcescens*)、シゲレラ属に属する微生物が挙げられる。

真核微生物の発現系としては、*Saccharomyces cerevisiae* を宿主とし、YRp 系、YEpl 系、YCp 系、Ylp 系のプラスミドを用いた系が知られている。また、ADH、GAPDH、PHO、GAL、PGK、ENO 等のプロモーター・ターミネーターが利用可能である。その他、クライベロマイセス属(例えば、*Kluyveromyces lactis* 等; 2 $\mu$ m 系、pKD1 系、pGKI1 系、KARS 系等のプラスミド)、シゾサッカロマイセス属(例えば、*Schizosaccharomyces pombe* 等; pAUR224 等)、チゴサッカロマイセス属(例えば、*Zygosaccharomyces rouxii* 等; pSB3、及び、*S.cerevisiae* 由来 PH05 プロモーター等)、ハンゼヌラ属(例えば、*Hansenula polymorpha* 等)、ピキア属(例えば、*Pichia pastoris* 等)、カンディダ属(例えば、*Candida maltosa*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Candida albicans* 等)、アスペルギルス属(例えば、*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* 等)、及びトリコデルマ属(例えば、*Trichoderma reesei* 等)等を本発明の発現ベクター系において用いることができる。

その他、植物細胞を宿主として用いることもできる。例えば、綿、トウモロコシ、ジャガイモ、トマト、ダイズ、ペチュニア、及びタバコ等由来の植物細胞を宿主とすることができる。特に良く知られた系として *Nicotina tabacum* 由来の細胞を用いたものが知られており、これをカルス培養すればよい。植物を形質転換する際には、例えば、pMON530 等の発現ベクターを用い、該ベクターを *Agrobacterium tumefaciens* 等の細菌に導入する。この細菌をタバコ(例えば、*Nicotina tabacum*)に感染させると、所望のポリペプチドをタバコの葉等から得ることができる。

カイコ(*Bombyx mori*)、カ(*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*)、ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)等の昆虫細胞を宿主として用いることも可能である。例えば、カイコを用いる場合、Db をコードする DNA をバキュロウイルスベクター等に挿入し、該ウイルスをカイコに感染させることによりカイコの体液から目的

のポリペプチドを得ることができる(Nature 315: 592-594 (1985))。

動物細胞を宿主として用いる場合には、例えば、pME18S(Med.immunol. 20: 27-32 (1990))、pEF-BOS(Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990))、pCDM8(Nature 329: 840-842 (1987))、pRSVneo、pSV2-neo、pcDNA1/Amp(Invitrogen)、pcDNA1、pAMoERC3Sc、pCDM8(Nature 329: 840 (1987))、pAGE107(Cytotechnology 3: 133 (1990))、pREP4(Invitrogen)、pAGE103(J.Biochem. 101: 1307 (1987))、pAMoA、pAS3-3、pCAGGS(Gene 108: 193-200 (1991))、pBK-CMV、pcDNA3.1(Invitrogen)、pZeoSV(Stratagene)等が発現ベクターとして挙げられる。プロモーターとしては、サイトメガロウイルスの IE 遺伝子のプロモーター及びエンハンサー、SV40 の初期プロモーター、RSV、HIV 及び MMLV 等のレトロウイルスの LTR、メタロチオネイン  $\beta$ -アクチン、伸長因子 1、HSP 等の動物細胞由来の遺伝子のプロモーター等を挙げる事ができる。その他、上述のようにウイルスベクターを用いることもできる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、シンプスウイルス、センダイウイルス、SV40、HIV 等の DNA 及び RNA ウイルスが挙げられる。

動物細胞宿主としては、マウス・ミエローマ細胞(例えば、SP2/0、NS0 等)、ラット・ミエローマ細胞(例えば、YB2/0 等)、マウス・ハイブリドーマ細胞、Nmalw a 細胞(KJM-1 細胞等も含む)、ヒト胎児腎臓細胞(293 細胞等)、ヒト白血病細胞(BALL-1 等)、CHO 細胞、COS 細胞(COS-1、COS-7 等)、ハムスター胎児腎臓細胞(BHK 等)、マウスセルトリ細胞(TM4 等)、アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76 等)、HBT637 細胞、HeLa 細胞、ウサギ腎臓細胞(MDCK 等)、ヒト肝臓細胞(HepG2 等)、マウス乳癌細胞(MMT060562 細胞)、TRI 細胞、MRC 細胞、FS3 細胞等がある。

発現ベクターの導入方法としては、宿主及びベクターの種類に依存するが、細胞に Db をコードする DNA を導入できる方法であれば、いずれも用いることができる。原核細胞へベクターを導入する方法としては、カルシウムイオンを用いる方



法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69: 2110 (1972))、プロトプラスト法(特開昭63-24829号公報)、エレクトポレーション法(Gene 17: 107 (1982); Molecular & General Genetics 168: 111 (1979))等があり; 酵母への導入方法としては、エレクトポレーション法(Methods in Enzymology, 194: 182 (1990))、スフェロプラスト法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81: 4889 (1984))、酢酸リチウム法(J.Bacteriol. 153: 163 (1983))等があり; 植物細胞についてはAgrobacterium法(Gene 23: 315 (1983); W089/05859等)や、超音波処理による方法(W091/00358)等が知られる; 動物細胞へベクターを導入する方法としてはエレクトポレーション(Cytotechnology 3:133 (1990))、リン酸カルシウム法(特開平2-227075号公報)、リポフェクション法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84: 7413 (1987); Virology 52: 456 (1973))、リン酸-カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、微小ガラス管を用いたDNAの直接注入法等が挙げられる。

上述のようにして取得された形質転換体は、例えば、以下の方法で培養することができる。

形質転換体が原核生物や真核微生物である場合は、培地は該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等の生育に必要な物質を含有し、形質転換体の効率的な培養を可能にするものであれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。培養は好氣的条件、嫌氣的条件のいずれで行ってもよく、生育温度、培地のpH、生育時間等の条件は、用いる形質転換体の種類に応じ適宜当業者により決定され得るのである。また、誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターについては、必要に応じてインデューサーを培地に添加すればよい(例えば、lacプロモーターであればIPTG、trpプロモーターであればIAA等)。

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、培地としてはTNM-FH培地(Pharmin gen)、Sf-900 II SFM培地(Life Technologies)、ExCell400及びExCell405(JRH Biosciences)、Grace's Insect Medium(Nature 195: 788 (1962))等を用いることができ、必要に応じゲンタマイシン等の抗生物質を添加してもよい。

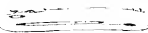
- 17 -

形質転換体が動物細胞である場合には、一般に使用されている RPMI1640 培地(The Journal of American Medical Association 199: 519 (1967))、Eagle の MEM 培地(Science 122: 501 (1952))、DMEM 培地(Virology 8: 396 (1959))、199 培地(Proceeding of the Society for the Biological Medicine 73: 1 (1950))、または、これらの培地に BSA 等を添加した培地を使用することができる。培養は通常の条件、例えば、pH6~8、30~40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で行うことができる。この際、必要に応じカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

このようにして得られた本発明の Db は、宿主細胞内、または、シグナル配列を用いて細胞外に分泌させた場合には培地等から単離し、実質的に純粋なポリペプチドとして精製することもできる。ポリペプチドの分離、精製は、一般的に使用される、クロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈澱、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、透析、再結晶等の方法を適宜選択し、必要に応じて組合せることにより行うことができる。クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R.Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Course Manual, Harlow and David Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988))。これらのクロマトグラフィーは、HPLC や FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。また、本発明の Db は抗原に対して結合することから、抗原への結合性を利用して精製することも可能である。

さらに、本発明は上述の scDb ライブラリーの作成方法において用いることができる、(I)2つの抗体可変領域をコードし、一方の可変領域と他方の可変領域が制限酵素切断部位を有するリンカーで結ばれている遺伝子、及び(II)2つの抗体可

- 18 -

変領域をコードし、その両端に制限酵素切断部位を付加した遺伝子に関する。これらの本発明の scDb ライブラリーの作成における材料となる遺伝子の可変領域は好ましくは、scFv として発現されるように重鎖可変領域と軽鎖可変領域とが長いリンカーで結合されているものである。 (I)または(II)を含む発現ベクターをバクテリオファージコート蛋白質融合(Smith, Science 228: 1315 (1985); Scott and Smith, Science 249: 386 (1990); Cwirla et al., Proc. Natl.Acad.Sci.USA 8: 309 (1990); Devlin et al., Science 249: 404 (1990); Wells and Lowman, Curr.Opin.Struct.Biol. 2: 597 (1992);米国特許第5,223,409号)等の方法によりファージ粒子表面上にディスプレイさせ、ディスプレイされたペプチドの表現型により選択することにより、それをコードする遺伝子も同時に得られるという点で有利である。

(I)及び(II)の遺伝子、または、該遺伝子を含む抗体ライブラリーを制限酵素処理し、連結することで本発明の4つの抗体可変領域をコードし、1番目の抗体可変領域と2番目の抗体可変領域の間、及び3番目の抗体可変領域と4番目の抗体可変領域の間に制限酵素切断部位が存在する遺伝子を得ることができる。このような遺伝子において、1番目と2番目の抗体可変領域の間及び3番目と4番目の抗体可変領域の間を短いリンカーで、2番目と3番目の抗体可変領域の間を長いリンカーで結合し、且つ、1番目が第一の抗原に対する重鎖可変領域、2番目が第二の抗原に対する軽鎖可変領域、3番目が第二の抗原に対する重鎖可変領域、そして4番目が第一の抗原に対する軽鎖可変領域の順で並んでいると、これを発現させた場合に二特異性単鎖ダイアボディを得ることができる。

本発明は、このような遺伝子を含むベクター及びライブラリー、並びに、該遺伝子によりコードされるペプチドを含むものである。

本発明はまた、

(a)抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素切断部位が2つ以上存在する長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、

- 19 -

(b)上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び

(c)上記処理により得られたフラグメントをセルフライゲーションすることにより、可変領域間のリンカーを短いリンカーにする工程

を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法を提供する。この方法により、本発明の scDb ライブラリーの作成方法を一特異性 Db へ応用することができる。例えば、ファージライブラリー構築時にリンカー内に例えば、下記のような BamHI サイト(下線部)を二箇所設けておく。

GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer (配列番号: 3)  
GGTGGTGGTGGATCCGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGCGGCGGCTCCGAGGTGGTGGATCC (配列番号: 4)

次に、上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子(例えば、パンニング等で濃縮したそれぞれのライブラリー内のファージミドあるいは上記ファージライブラリーから PCR を用いて増幅した遺伝子など)を、BamHI で処理し、自己閉環させることでリンカーの長さを scFv 用の 20 残基からダイアボディに最適の 5 残基

(“GGTGGTGGTGGATCC (配列番号: 5) ”

によりコードされる“GlyGlyGlyGlySer (配列番号: 6) ”)にすることが出来る。こうして出来た受容体結合抗体を含む VL-VH 断片を適当な発現ベクターに挿入することによって生物活性を指標に Db をスクリーニングすることが出来る。例えば、サイトカイン受容体に対する抗体ライブラリーを用いて構築した Db ライブラリーをレトロウイルスベクターに挿入し、目的サイトカイン依存性増殖細胞に感染させることによってアゴニスト Db を選択することができる。

本発明の scDb は、従来知られている多特異性抗体と同様に、免疫診断、治療及び免疫学的検定による診断等の臨床分野において有用である。例えば、腫瘍細胞を殺す等の細胞障害性を誘起するため、ワクチンアジュバントとして、血栓溶解剤等の薬剤を適切に生体内において標的に対して運搬するため、酵素により活性

## - 20 -

化されるプロドラッグを標的部位において確実に変換するため、感染性の疾患の治療用に、細胞表面受容体に対して免疫複合体を誘導するため、免疫毒素等を腫瘍細胞等の標的細胞に運搬するため等、様々な治療目的が考えられる。

このような治療目的で使用される本発明の Db を含む医薬組成物は、必要に応じ、それらに対して不活性な適当な薬学的に許容される担体、媒体等と混和して製剤化することができる。例えば、滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤(アスコルビン酸等)、緩衝剤(リン酸、クエン酸、他の有機酸等)、防腐剤、界面活性剤(PEG、Tween 等)、キレート剤(EDTA 等)、結合剤等を挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、マンニトールやソルビトール等の糖アルコールを含んでいてもよい。注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、PEG 等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート 80、HCO-50)等と併用してもよい。

また、必要に応じ本発明の Db をマイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リボソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる("Remington's Pharmaceutical Science 16<sup>th</sup> edition", Oslo Ed. (1980)等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明の Db に適用し得る(Langer et al., J.Biomed.Mater.Res. 15: 167-277 (1981); Langer, chem.Tech. 12: 98-105 (1982);米国特許第 3,773,919 号;欧州特許出願公開(EP)第 58,481 号;Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983);EP 第 133,988 号)。

患者への投与は、好ましくは注射や点滴により行われ、例えば、動脈内注射、

## - 2 1 -

静脈内注射、皮下注射等のほか、鼻腔内、経気管支、筋内、経皮または経口等の経路により当業者に公知の方法により行い得る。投与量は、患者の体重、年齢、疾病の種類、症状、投与方法等の種々の要因により変化するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することができる。

また、本発明の Db をコードする遺伝子を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与方法としては、naked プラスミドによる直接投与の他、リボソーム等にパッケージングするか、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター、HVJ ベクター等の各種ウイルスベクターとして形成するか(Adolph『ウイルスゲノム法』, CRC Press, Florida (1996)参照)、または、コロイド金粒子等のビーズ担体に被覆(W093/17706 等)して投与することができる。しかしながら、生体内において Db が発現され、その作用を発揮できる限りいかなる方法により投与してもよい。好ましくは、適当な非経口経路(静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介する注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法(電子銃等による)、添着薬等粘膜経路を介する方法等)により十分な量が投与される。*ex vivo*においてリボソームトランスフェクション、粒子衝撃法(米国特許第 4,945,050 号)、またはウイルス感染を利用して血液細胞及び骨髓由来細胞等に投与して、該細胞を動物に再導入することにより本発明の Db をコードする遺伝子を投与してもよい。

本発明の Db は酵素免疫分析に用いることもできる。このためには、Db の一方の抗体可変領域は酵素上の酵素活性を阻害しないエピトープを、そして他方は担体に結合するような担体を認識するように設計する。例えば、IgG、フェリチン、HRP 及びホルモン等を認識する Db を挙げることができる。

また、本発明の Db は *in vivo* 及び *in vitro* における種々の疾病の免疫診断に用いることも可能である。例えば、Db の一方の抗体可変領域を腫瘍細胞に特異的な抗原等を認識するようにし、他方は検出可能なマーカーに結合するように設計

- 2 2 -

することができる。検出可能なマーカーとしては放射性同位体(例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 等)、蛍光色素(フルオレセイン、ルシフェリン等)、化学ルミネセンス化合物(イソチオシアネート、ローダミン等)、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、HRP等の汎用の酵素等を挙げることができ、Dbのこれらの物質との結合及び検出は公知の方法に従って行うことができる(Hunter et al., Nature 144: 945 (1962); David et al., Biochemistry 13: 1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth. 40: 219 (1981); Nygen, J. Histochem and Cytochem 30: 407 (1982)参照)。

このように検出可能な物質に対して反応性を有する本発明のDbは、拮抗的結合分析、直接的及び間接的なサンドイッチ免疫分析(ELISA等)、免疫沈降分析(Zola, "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", pp.147-158, CRC Press Inc. (1987))等を含む、種々の分析において用いることができる。

### 図面の簡単な説明

図1は、抗原A、Bに対する二特異性 scDb ライブラリーの構築方法を概略的に示す図である。

図2は、ファージ抗体ライブラリーからの Db ライブラリーの構築方法を概略的に示す図である。

### 産業上の利用の可能性

本発明により、新規な二特異性 scDb ライブラリーの構築法が提供される。本発明の方法により、二特異性 scDb ライブラリーを scFv のファージライブラリーから煩雑な処理なしに一括処理により作成することができる。また、本発明は、ファージ抗体ライブラリーからパニング等によって濃縮した抗体クローンを一括して動物細胞用の発現ベクターに移す方法を提供するものである。

- 23 -

請求の範囲

1. 2つの抗体可変領域をコードし、一方の抗体可変領域と他方の抗体可変領域が制限酵素切断部位を有するリンカーで結ばれている遺伝子。
2. リンカーに制限酵素切断部位が2つ以上存在することを特徴とする請求項1記載の遺伝子。
3. 2つの抗体可変領域の一方が重鎖可変領域であり、他方が軽鎖可変領域である請求項1または2記載の遺伝子。
4. 2つの抗体可変領域が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の遺伝子。
5. 2つの抗体可変領域をコードし、その両端に制限酵素切断部位を付加した遺伝子。
6. 2つの抗体可変領域の一方が重鎖可変領域であり、他方が軽鎖可変領域である請求項5記載の遺伝子。
7. 2つの抗体可変領域をコードする遺伝子が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする請求項5または6記載の遺伝子。
8. 4つの抗体可変領域をコードし、1番目の抗体可変領域と2番目の抗体可変領域の間、及び3番目の抗体可変領域と4番目の抗体可変領域の間に制限酵素切断部位が存在することを特徴とする遺伝子。
9. 1番目と2番目の抗体可変領域の間及び3番目と4番目の抗体可変領域の間に短いリンカーで結ばれ、2番目と3番目の抗体可変領域の間に長いリンカーで結ばれていることを特徴とする請求項8記載の遺伝子。
10. 4つの抗体可変領域が第一の抗原に対する重鎖可変領域、第一の抗原に対する軽鎖可変領域、第二の抗原に対する重鎖可変領域、第二の抗原に対する軽鎖可変領域である請求項8～9記載の遺伝子。
11. 第一の抗原に対する軽鎖可変領域、第二の抗原に対する重鎖可変領域、第



- 2 4 -

二の抗体に対する軽鎖可変領域、第一の抗原に対する重鎖可変領域の順に並んでいる請求項 10 記載の遺伝子。

12. 以下の工程を含む二特異性単鎖ダイアボディをコードする遺伝子の作成方法

- (a)請求項 1～4 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、
- (b)請求項 5～7 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び
- (c)(b)の工程で作成した遺伝子を、(a)の工程で作成した遺伝子の間に挿入する工程、

を含む方法。

13. 請求項 1～11 いずれかの記載の遺伝子によりコードされるペプチド。

14. 請求項 1～11 のいずれか記載の遺伝子を含む抗体ライブラリー。

15. 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法。

- (a)第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素部位を含む長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、
- (b)第二の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域が長いリンカーで結ばれ、それぞれの可変領域のリンカーが付加していない側に制限酵素部位が存在している抗体ファージライブラリーを作成する工程、
- (c)(a)及び(b)で作成したファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び
- (d)上記処理により得られたフラグメントをライゲーションすることにより、第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域の間に、第二の抗原に対する重鎖可変領域と軽鎖可変領域が挿入されたフラグメントを作成する工程。

16. 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法

- (a)請求項 1～4 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、
- (b)請求項 5～7 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び

- 25 -

(c)(b)の工程で作成した遺伝子を、(a)の工程で作成した遺伝子の間に挿入する工程。

17. 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法、

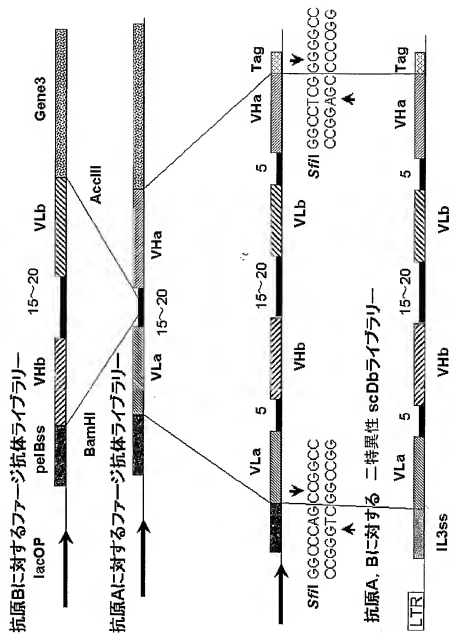
(a)抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素切断部位が2つ以上存在する長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、

(b)上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び

(c)上記処理により得られたフラグメントをセルフライゲーションすることにより、可変領域間のリンカーを短いリンカーにする工程。

18. 請求項1～11いずれか記載の遺伝子を含む発現ベクター。

☒ 1



2 / 2

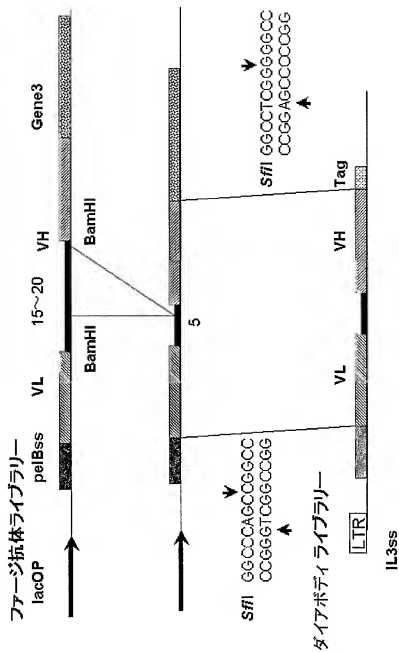


図 2

1 / 4

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

&lt;120&gt; A method for scDb library construction

&lt;130&gt; C1-A0203P

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP 2002-112369

&lt;151&gt; 2002-04-15

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:linker

2 / 4

&lt;400&gt; 1

ggtaggtggtg gatccggtgg tggtaggttct ggccggcggcg gctccggagg tggtaggttct 60

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:linker

&lt;400&gt; 2

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

10

15

Gly Gly Gly Ser

20

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

3 / 4

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:linker

&lt;400&gt; 3

ggtggtggtg gatccggtg tgggtgttct ggcggcgcg getccggagg tggggatcc 60

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:linker

&lt;400&gt; 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

10

15

Gly Gly Gly Ser

20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

4 / 4

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:linker

&lt;400&gt; 5

ggtggtggtg gatcc

15

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:linker

&lt;400&gt; 6

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04773

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>1</sup> C07K16/46, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>1</sup> C07K16/46, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq,  
SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCGUINNESS B.T. et al., Phage diabody repertoires for selection of large number of bispecific antibody fragments. Nature Biotechnology 1996, Vol.14, No.9, pages 1149 to 1154	1-11, 13, 14, 18 12, 15-17
A	DENARDO D.G. et al., Anti-HLA-DR/anti-DOTA diabody construction in modular gene design platform: bispecific antibodies for pretargeted radioimmunotherapy. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 2001, Vol.16, No.6, pages 525 to 535	1-18
A	ANDRIS-WIDHOPF J. et al., Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. Journal of Immunological methods 2000, Vol.242, pages 159 to 181	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
02 May, 2003 (02.05.03)Date of mailing of the international search report  
20 May, 2003 (20.05.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04773

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TURNER D.J. et al., Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments: optimization of peptide sequence using phage display technology. Journal of Immunological methods 1997, Vol.205, pages 43 to 54	1-18
A	TANG Y. et al., Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology. The Journal of Biological Chemistry 1996, Vol.271, No.26, pages 15682 to 15686	1-18
A	HOLLIGER P. et al., "Diabodies", small bivalent and bispecific antibody fragments. Proc.Natl.Acad. Sci.USA 1993, Vol.90, pages 6444 to 6448	1-18

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 16/46, C12N 15/09

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 16/46, C12N 15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	MCGUINNESS B.T. et al, Phage diabody repertoires for selection	1-11, 13, 14, 18
A	of large number of bispecific antibody fragments. Nature Biotechnology 1996, Vol. 14, No. 9, p. 1149-1154	12, 15-17
A	DENARDO D.G. et al, Anti-HLA-DR/anti-DOTA diabody construction in modular gene design platform: bispecific antibodies for pretargeted radioimmunotherapy. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 2001 Vol. 16, No. 6, p. 525-535	1-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.05.03

国際調査報告の発送日

20.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ANDRIS-WIDHOPF J. et al, Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. Journal of Immunological methods 2000, Vol. 242, p. 159-181	1-18
A	TURNER D. J. et al, Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments: optimisation of peptide sequence using phage display technology. Journal of Immunological methods 1997, Vol. 205, p. 43-54	1-18
A	TANG Y. et al, Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology. The Journal of Biological Chemistry 1996, Vol. 271, No. 26, p. 15682-15686	1-18
A	HOLLIGER P. et al, "diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, Vol. 90, p. 6444-6448	1-18